

И.В. МАЙБОРОДИН ^{1,2}, А.А. ШЕВЕЛА ², С.В. МАРЧУКОВ ²,
В.В. МОРОЗОВ ², В.А. МАТВЕЕВА ², В.И. МАЙБОРОДИНА ¹,
А.М. НОВИКОВ ³, Ю.В. ТОРНУЕВ ¹, Б.В. ЧУРИН ¹, А.И. ШЕВЕЛА ²



ПРОЛОНГАЦИЯ ОЧИЩЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ ТКАНЕЙ ОТ ДЕТРИТА В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКСОСОМ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины

Министерства науки и высшего образования РФ,

Институт молекулярной патологии и патоморфологии ¹,

Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук ²,

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии ³, г. Новосибирск,
Российская Федерация

Цель. Изучить влияние экзосом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ЭМСК) на мягкие ткани, поврежденные в процессе имплантации в кость металлического винтового изделия.

Материал и методы. В проксимальных мыщелках большеберцовой кости беспородных кроликов создавали дефект диаметром 2 мм и глубиной 4 мм. В дефект имплантировали металлические винтовые изделия с предварительным введением физиологического раствора (контроль, 9 животных) или 19,2 мкг ЭМСК на каждую конечность (опыт, 10 особей). Через 3; 7 и 10 суток после операции животных выводили из эксперимента, гистологические срезы мягких тканей с поверхности мыщелка, окрашенные гематоксилином и эозином, изучали методом световой микроскопии.

Результаты. Применение водяного охлаждения в процессе внедрения металлического имплантата в проксимальный мыщелок большеберцовой кости не приводит к полному удалению мелких костных фрагментов, которые впоследствии или элиминируются наружу с раневым отделяемым, или подвергаются деструкции и лизису макрофагами. В результате влияния ЭМСК на мягкие ткани рядом с участком повреждения уменьшается активность послеоперационного воспаления, что приводит к замедлению рассасывания геморрагий, элиминации фибриновых сгустков, детрита и мелких костных фрагментов. Даже на 10-е сутки на фоне использования ЭМСК в послеоперационной ране присутствует бесструктурный детрит с небольшим числом инфильтрирующих клеточных элементов, а также значительное число многоядерных макрофагов со слившейся цитоплазмой, нежизнеспособных лизируемых поперечнополосатых мышечных симпластов и костных фрагментов с малой степенью их деградации.

Заключение. Супрессия воспаления ЭМСК задерживает очищение послеоперационной раны, способствует пролонгации репаративного процесса и присоединению к воспалению гранулематозного компонента. Применение ЭМСК в процессе интраоссальной имплантации может быть показано только для контроля активности воспалительного процесса и при условии максимального предварительного очищения послеоперационной раны от детрита, в том числе нежизнеспособной мышечной ткани и костных фрагментов.

Ключевые слова: поврежденные ткани, экзосомы мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, регенерация, воспаление, макрофаги

Objective. To study the effect of exosomes of multipotent mesenchymal stromal cells (EMSCs) on soft tissues damaged during implantation of a metal screw into the bone.

Methods. A defect (2 mm in diameter and 4 mm in depth) was created in the tibial proximal condyles of outbred rabbits. Metal screws were implanted into the defect by preliminary injection of saline (control, n=9 animals) or 19.2 g of EMSCs per limb (experiment, n=10 rabbits). After 3, 7 and 10 days following the operation, the animals were taken out from the experiment; histological sections of soft tissues from the condyle surface, stained by hematoxylin and eosin were studied using light microscopy.

Results. The use of water cooling in the process of introducing the metal implant into the tibial proximal condyle does not lead to complete removal of small bone fragments, which are subsequently either eliminated outward with wound discharge, or are destroyed and are subjected to lysis by macrophages. As a result of the EMSC effect on soft tissues near the site of damage, the activity of the postoperative inflammation reduces, leads to a slowdown in the resorption of hemorrhages, the elimination of fibrin clots, detritus and small bone fragments. Even on the 10th day after using EMSCs in the postoperative wound a structureless detritus with a small number of

infiltrating cells was present, as well as a significant number of multinucleated macrophages with fused cytoplasm, non-viable lysed striated muscle symplasts and bone fragments with a low degree of degradation.

Conclusion. Suppression of inflammation by EMSCs delays the clearance of the postoperative wound, promotes the prolongation of the repair process and the attachment of the granulomatous component to the inflammation. The using EMSCs in the process of intraosseous implantation may be recommended only to control the activity of the inflammatory process and only after maximum preliminary cleansing of the postoperative wound from detritus, including non-viable muscle tissue and bone fragments.

Keywords: damaged tissues, exosomes of multipotent mesenchymal stromal cells, regeneration, inflammation, macrophages

Novosti Khirurgii. 2021 Aug-Sep; Vol 29 (4): 401-411
Prolongation of Cleansing Damaged Tissues from Detritus
Using Exosomes of Multipotent Stromal Cells

I.V. Maiborodin, A.A. Shevela, S.V. Marchukov, V.V. Morozov, V.A. Matveeva,
V.I. Maiborodina, A.M. Novikov, Yu.V. Tornuev, B.V. Churin, A.I. Shevela

The articles published under CC BY NC-ND license



Научная новизна статьи

Впервые показано, что после экспериментального применения экзосом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для воздействия на регенерацию операционной травмы мягких тканей после внутрикостной имплантации возможно уменьшение активности воспалительной реакции, что приводит к замедлению рассасывания геморрагий, элиминации фибриновых сгустков, детрита и мелких костных фрагментов, и соответственно, пролонгации очищения поврежденных тканей и задержке репарации.

What this paper adds

It has been firstly shown that after the experimental use of exosome of multipotent mesenchymal stromal cells to influence the regeneration of surgical trauma of soft tissues after intraosseous implantation, it is possible to reduce the activity of the inflammatory reaction, which leads to a slowdown of resorption of hemorrhages, elimination of fibrin clots, detritus and small bone fragments and, accordingly, prolongation of cleansing damaged tissue and delayed repair.

Введение

Первоначально в литературе было очень много данных о положительном влиянии мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) на различные патологические процессы, в том числе и на регенерацию костной ткани [1], но по мере продолжения изучения этой проблемы стали накапливаться результаты о недостатках и побочных эффектах клеточной терапии. Остаются без ответа вопросы относительно безопасности, устойчивости и воспроизводимости действия, эффективности и оптимальных способов применения МСК, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом [2]. Был найден более значительный ингибирующий эффект МСК на иммунокомпетентные клетки онкологических пациентов, что создает благоприятные условия для прогрессии опухоли и уклонения ее клеточных элементов от реакций системы иммунитета [3]. Терапия МСК может индуцировать воспалительные реакции. Стимулированные аллогенными МСК мононуклеары периферической крови значительно снижают содержание противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-1ra, TGF- β 1) и увеличивают уровень провоспалительных медиаторов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , SAA (белок-предшественник амилоида)), также возрастает процент CD14+ клеток по сравнению с мононуклеарами после воздействия липополисахаридом, но без активации МСК [4]. Введение мышам МСК на фоне экспериментального гепатита В увеличивало

экспрессию генов вируса и его репликацию in vivo вследствие супрессии активности и цитотоксических функций натуральных клеток-киллеров in vivo и in vitro, а также рецепторов для их активации в печени. В связи с этим не исключено увеличение продолжительности периода избавления организма от указанного инфекционного агента [5].

Полученные из МСК внеклеточные везикулы, несущие различные компоненты клетки, были описаны как фундаментальный механизм межклеточной коммуникации [6]. Действие экстрацеллюлярных везикул, в том числе и экзосом, продуцируемых МСК (ЭМСК), в большей мере сходно с эффектами самих МСК [7], включая эффективность в отношении влияния на репарацию костных дефектов [8]. В связи с этим направление исследований постепенно стало смещаться в сторону ЭМСК, которые лишены многих неблагоприятных влияний, имеющих у продуцирующих их клеток. Не исключено, что со временем появятся данные и о нежелательных эффектах использования экзосомальных фракций.

Цель. Изучить влияние экзосом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ЭМСК) на мягкие ткани, поврежденные в процессе имплантации в кость металлического винтового изделия.

Материал и методы

Работа основана на результатах изучения

состояния мягких тканей, прилегающих к проксимальному мыщелку большеберцовой кости 19 беспородных кроликов обоего пола весом 3-4 кг, в различные сроки после внутрикостной установки винтовых титановых имплантатов без и с применением ЭМСК. Все манипуляции не были связаны с причинением боли животным и проведены с соблюдением ГОСТ 33215-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур) и ГОСТ 33216-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами).

Получение, культивирование и характеристики МСК, выделение ЭМСК

МСК получали из костного мозга крысы-самца инбредной линии Wag весом 180 г, возрастом 6 месяцев, характеризовали и культивировали в соответствии с нашими прошлыми работами [8]. На стадии стационарного роста стабильной культуры 3-го пассажа МСК при достижении конfluence клеточного монослоя 80-90% собирали кондиционную среду, из которой, согласно нашим предыдущим работам и рекомендациям других исследователей [8, 9], выделяли ЭМСК. Для удаления клеток, клеточного дебриса, апоптозных телец и крупных везикул кондиционную среду последовательно центрифугировали: 10 мин. при 300g, 10 мин. при 2000g, 30 мин. при 12000g. Экзосомы осаждали, центрифугируя супернатант 2 часа при 100000g, и ресуспендировали в физиологическом растворе на фосфатном буфере. Количество ЭМСК определяли по содержанию белка в осадке, используя коммерческий набор «Qubit protein assay kit» (Thermo Fisher Scientific, USA) и флуориметр «Qubit® 3.0».

Внутрикостная имплантация с применением ЭМСК

Хирургическое вмешательство проводили с соблюдением всех правил асептики и антисептики в условиях общей внутривенной анестезии пропофолом. В обоих проксимальных мыщелках большеберцовой кости 19 беспородных кроликов весом 3-4 кг стоматологическим бором диаметром 2 мм, с охлаждением стерильным физиологическим раствором создавали стандартизированные отверстия на глубину 4 мм [8].

Далее дефект кости инсулиновым шприцем заполняли физиологическим раствором на фосфатном буфере (контроль, 9 кроликов) [10] или вводили по 19,2 мкг ЭМСК в физиологическом растворе на каждую конечность (опыт,

10 животных). Доза ЭМСК выбрана исходя из средних данных, рекомендованных другими исследователями [10]. Через 10-20 секунд со стабильной первичной фиксацией до 30 Нсм внедряли винтовые дентальные имплантаты (изделия 3,5×8 мм с шероховатой поверхностью; 3S, Israel), устанавливали винт-заглушку и послойно без натяжения ушивали операционную рану.

Через 3; 7 и 10 суток после операции животных выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков. В каждой группе было 3 животных, кроме срока в 3 дня после введения ЭМСК (4 особи).

Морфологические методы исследования

После удаления кожных покровов мягкие ткани с поверхности мыщелка в непосредственной близости от имплантата фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 1 суток, обезживляли и просветляли в реактиве «Изопреп» (БиоВитрум, Россия) и заключали в гистопласт. Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, изучали на световом микроскопе Axioimager M1 (Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз.

Результаты

У кроликов из контрольной группы на 3-й день после операции в мягких тканях на поверхности мыщелка большеберцовой кости, прилегающих к металлическому имплантату, а значит, и находящихся непосредственно в зоне повреждения, обнаружены выраженный отек, геморагии и некробиотические изменения с выраженной воспалительной реакцией. Детрит, фибриновые и эритроцитарные массы были обильно инфильтрованы лейкоцитами, среди которых было много нейтрофилов. На таких участках были отчетливые признаки начала образования рубца — присутствие молодых фибробластов и формирование межклеточного матрикса. Лейкоцитарные инфильтраты проникали глубоко в мышечные ткани, а среди инфильтрированного лейкоцитами детрита были расположены нежизнеспособные фрагменты поперечнополосатых мышечных симпластов (рис. 1 А). Необходимо отметить, что иногда достаточно редко, но у каждого животного, встречались нежизнеспособные костные фрагменты, по-видимому, опилки, получившиеся при высверливании отверстия в кости для вкручивания винтового имплантата. Эти костные частицы или были окружены и инфильтрованы по периферии макрофагами (крупные фрагменты),

или фагоциты полностью разделяли их на еще более мелкие небольшие опилки (рис. 1 Б).

На 3-и сутки после имплантации с применением ЭМСК в тканях обнаружены более обширные геморрагии и практически отсутствующие явления отека. Эти геморрагии и фибриновые сгустки, как и в контроле, были инфильтрированы лейкоцитами, но в меньшей степени, и там присутствовали фибробласты (рис. 2 А). Необходимо отметить наличие в образцах от всех 4 животных различных по величине костных фрагментов. Мелкие фрагменты были уже полностью инфильтрированы и разрушены многоядерными макрофагами со слившейся цитоплазмой, а в более крупных явления макрофагальной деструкции происходили только на периферии, центральная часть представляла собой однородную эозинофильную бесклеточную массу (рис. 2 Б).

Через 7 суток у кроликов контрольной группы все мягкие ткани в области повреждения кости — у шейки имплантата — представляли собой молодую рыхлую волокнистую соединительную ткань с большим числом фибробластов и в разной степени инфильтрированную лимфоцитами и макрофагами (рис. 1 В). Иногда в этой формирующейся соединительной ткани встречались некротизированные костные фрагменты диаметром до 300 мкм на разной стадии деструкции. Некоторые костные частицы были окружены подобием капсулы из концентрических слоев молодой соединительной ткани и были инфильтрированы лимфоцитами, нейтрофилами, моноцитами и макрофагами (рис. 1 Г). В других случаях деструкция кости шла через формирование многоядерных макрофагов со слившейся цитоплазмой и инфильтрацию нежизнеспособной ткани такими клетками. Также в соединительной ткани присутствовали места с уже полностью лизированной костью, и только бесформенные однородные эозинофильные депозиты небольшого размера и без лейкоцитарной и соединительнотканной реакций свидетельствовали о расположении там некротизированного костного фрагмента в прошлом.

После имплантации с последующим введением ЭМСК на 7-е сутки в мягких тканях рядом с шейкой внедренного изделия, несмотря на начало формирования молодой соединительной ткани, еще оставались признаки некроза и воспаления. Ткани были отечны, содержали детрит и геморрагии, которые только начинали рассасываться и замещаться соединительной тканью: появление лейкоцитов и фибробластов, которые синтезировали незначительный объем межклеточного матрикса. Частично была некротизирована и поперечнополосатая

мышечная ткань, прилегающая к месту операции, нежизнеспособные симпласты еще не были полностью лизированы макрофагами (рис. 2 В). Во всех наблюдениях ткани содержали мелкие костные фрагменты, что примечательно, в основном с формированием слившихся многоядерных макрофагов вокруг. Кроме того, гигантские клетки инородных тел во множестве присутствовали и в тканях вне частиц кости: в формирующейся соединительной ткани и рядом с некротизированными мышцами (рис. 2 Г).

На 10-е сутки в контроле рядом с внедренным изделием продолжалось формирование соединительной ткани, которая становилась похожей на плотную волокнистую, в ней постепенно снижалось количество клеточных элементов и возрастало — межклеточного вещества. Рядом с такой волокнистой соединительной тканью и по ее границе продолжался лизис нежизнеспособных мышечных симпластов, между которыми развивалась рыхлая неоформленная соединительная ткань. Ни в одном случае на этом сроке в области лизиса и склеротической трансформации поперечнополосатых мышечных симпластов не было найдено гигантских клеток инородных тел, хотя макрофаги присутствовали в очень высоком количестве (рис. 1 Д). Только у 2 животных в соединительной ткани в области шейки имплантата были найдены костные фрагменты, и по большей части они были практически полностью лизированы (рис. 1 Е), иногда только по небольшим остаткам гранулам можно было определить местонахождение таких объектов.

Спустя 10 дней после внедрения имплантатов в условиях предварительного введения ЭМСК мягкие ткани на месте хирургического вмешательства представляли собой плотную или рыхлую волокнистую соединительную ткань с большим числом форменных элементов крови на отдельных участках. У всех животных этой группы на данный срок эксперимента в соединительной ткани рядом с шейкой имплантата были расположены остатки лизируемых костных фрагментов (рис. 2 Д). В некоторых случаях рядом с многоядерными макрофагами со слившейся цитоплазмой содержались однородные эозинофильные массы, скорее всего, частицы обызвествленной костной ткани, в других — фрагменты кости были полностью инфильтрированы многоядерными макрофагами, а иногда только группы гигантских клеток инородных тел свидетельствовали, что ранее на таких участках длительное время присутствовали нежизнеспособные ткани — костные отломки и поперечнополосатые мышечные симпласты (рис. 2 Е).

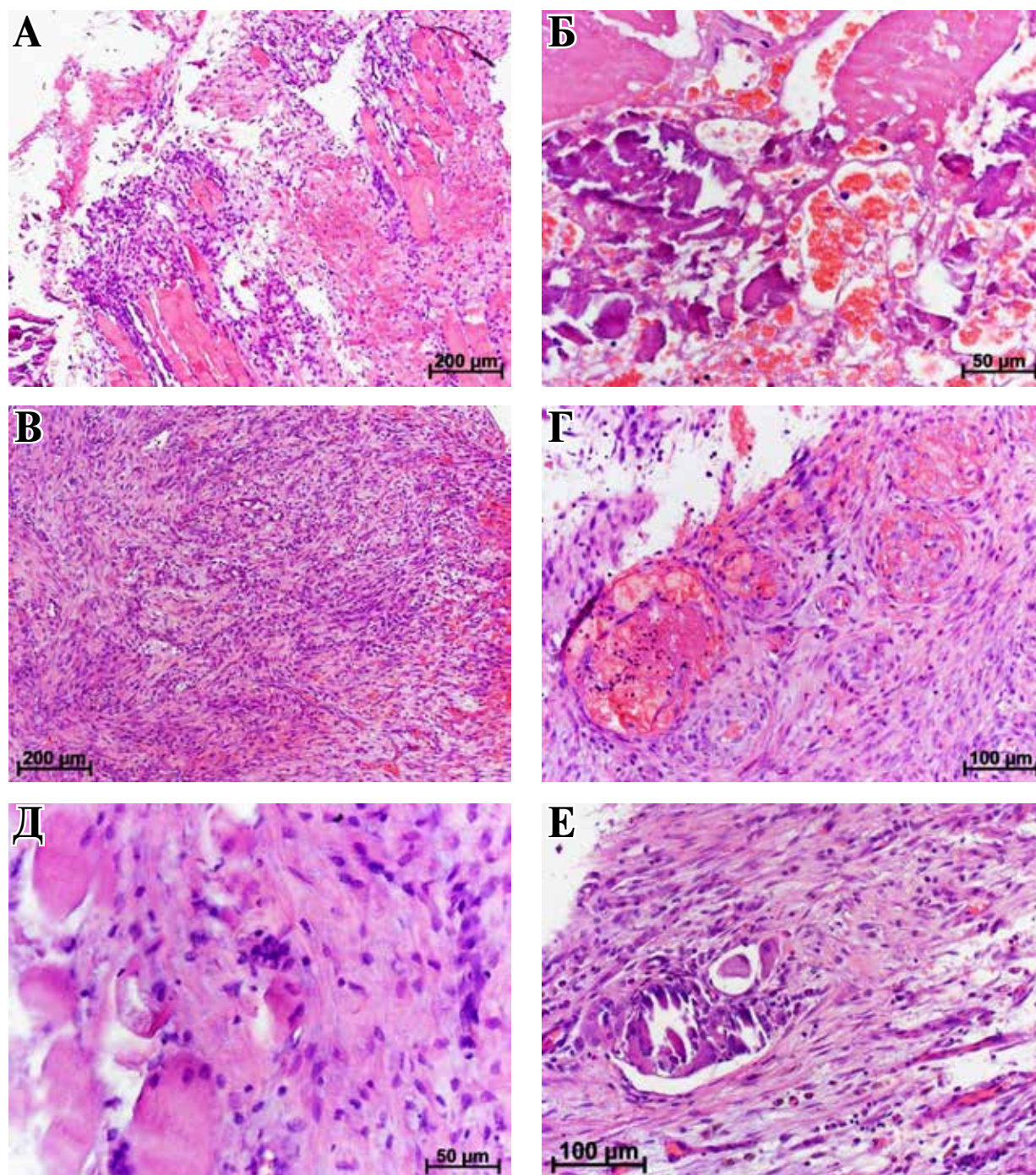


Рис. 1. Ткани с поверхности проксимального мышечка большеберцовой кости контрольных кроликов рядом с внутрикостным металлическим винтовым имплантатом. Окраска гематоксилином и эозином. А, Б – 3 суток; В, Г – 7 дней; Д, Е – 10 суток после операции. А – Геморрагии, сгустки фибрина и детрит инфильтрованы лейкоцитами, выраженный отек, группы поперечнополосатых мышечных симпластов окружены эритроцитами и дебрисом. Б – Нежизнеспособный костный фрагмент инфильтрован и разделен макрофагами на мелкие части. Рядом расположенный участок кровоизлияния разрезан фибрином. В – Поврежденные ткани полностью замещены молодой волокнистой соединительной тканью с большим содержанием фибробластов. Г – Костные фрагменты окружены концентрическими слоями соединительной ткани, инфильтрованы лейкоцитами. Д – Некроз, лизис и замещение плотной волокнистой соединительной тканью поперечнополосатых мышечных симпластов, возле которых много макрофагов, но отсутствуют гигантские клетки инородных тел. Е – Многоядерные макрофаги со слившейся цитоплазмой инфильтрируют практически полностью разрушенный костный фрагмент.

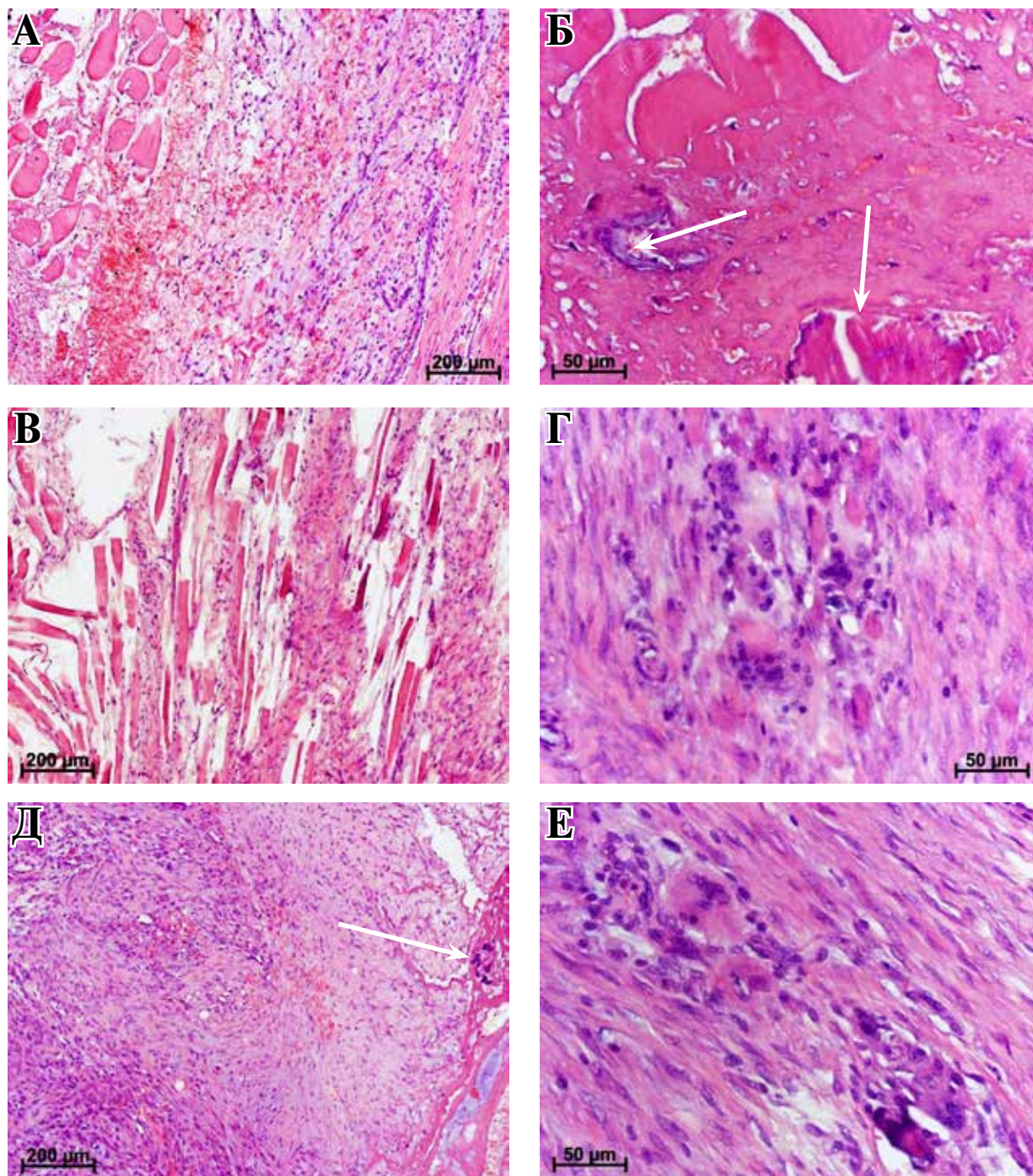


Рис. 2. Мягкие ткани возле титанового имплантата после его внедрения в проксимальный мышечек большеберцовой кости с предварительным введением ЭМСК в эксперименте. Окраска гематоксилином и эозином. А, Б – 3 суток; В, Г – 7 дней; Д, Е – 10 суток после имплантации. А – Обширные геморрагии, проникающие в мышечную ткань и инфильтрированные лейкоцитами и фибробластами с разреженным межклеточным матриксом, явления отека очень слабые. Б – Среди гомогенного детрита с очень слабой лейкоцитарной инфильтрацией содержатся костные фрагменты (стрелки) различных размеров, по краям или полностью инфильтрированные многоядерными макрофагами со слившейся цитоплазмой. В – Явления отека, детрит, костные фрагменты и неоформленная соединительная ткань с некротизированными мышцами. Г – Гигантские клетки инородных тел в молодой соединительной ткани рядом с нелизированными остатками мышечных симпластов. Д – Формирование соединительной ткани не закончено, присутствует много детрита, эритроцитов и нежизнеспособных фрагментов костной ткани (стрелки). Е – Многоядерные макрофаги со слившейся цитоплазмой в плотной волокнистой соединительной ткани.

Обсуждение

Таким образом, даже применение водяного охлаждения в процессе имплантации не приводит к полному удалению мелких костных фрагментов, которые впоследствии или элиминируются наружу с раневым отделяемым, или подвергаются деструкции и лизису макрофагами.

Пересечение кровеносных сосудов при хирургическом вмешательстве является причиной геморрагий, необходимость гемостаза приводит к появлению в тканях обширных сгустков фибрина. Повреждение тканей во время имплантации сопровождается отеком и образованием детрита, который постепенно или удаляется наружу вместе с отечной жидкостью, или разжижается ферментами лейкоцитов, которые могут и экзоцитировать протеолитические энзимы наружу [11]. Далее такой частично или полностью лизированный детрит также вместе с раневым отделяемым элиминируется из тканей или всасывается в сосудистое русло, преимущественно лимфатическое. Крупные фрагменты детрита могут эмболизировать лимфатические сосуды на протяжении или привести к непроходимости синусной системы регионарных лимфатических узлов. Блокада лимфатического русла в регионе имплантации будет способствовать нарастанию отека.

Постепенно, в данном случае к 3-м суткам после имплантации, детрит в тканях практически исчезает, остаются только медленно лизируемые крупные фрагменты некротизированных симпластов скелетных мышц и костных отломков. Также подвергаются лейкоцитарной инфильтрации геморрагии и отложения фибрина, начинается их лизис. Вместе с лейкоцитами в толщу эритроцитарных и фибриновых масс проникают фибробласты и по всему объему начинается синтез внеклеточных компонентов соединительной ткани. Кровоизлияния распространяются по межмышечным пространствам, соответственно, туда для фагоцитоза и лизиса внесосудистых эритроцитов и фибрина также мигрируют лейкоциты и фибробласты, между симпластами возрастает уровень лейкоцитарной инфильтрации, а за счет попадания детрита, те же сгустки крови в лимфатическое русло с его эмболизацией нарастают явления отека.

Существует вероятность, что ЭМСК из места введения — из высверленного отверстия под металлический имплантат, возможно, под давлением закручиваемого имплантата распределяются по мягким тканям в области имплантации, оказывая свое иммуномодуляторное влияние [9,

12, 13, 14] на течение воспалительной реакции и репаративного процесса.

Участки геморрагий на срезе шире, а объем детрита больше после применения ЭМСК, чем в контроле. Можно предположить, что в результате описанного иммуномодуляторного эффекта ЭМСК, связанного с подавлением пролиферации, миграции и функциональной активности иммунокомпетентных клеток, лизис геморрагий и детрита идет медленнее. Более крупные фрагменты детрита остаются в тканях, а не блокируют лимфатические сосуды и узлы, что способствует менее выраженному отеку. Также затруднена элиминация крупного детрита наружу с раневым отделяемым через хирургический разрез между кожными швами, тем более, что в месте повреждения меньше отечной жидкости. Меньший уровень отека, обширные кровоизлияния и больший объем детрита в тканях, в том числе и костные фрагменты, являются свидетельством замедления очистки раны после хирургического вмешательства. Не исключено, что отсрочка лизиса и удаления детрита из места операции может задерживать репарацию тканей.

На 7-й и 10-й день у животных из группы контроля в мягких тканях вокруг места имплантации завершается лизис нежизнеспособных костных частиц и мышечных симпластов, и продолжается оформление соединительной ткани в плотную волокнистую — фактически рубец на поверхности проксимального мышечка большеберцовой кости.

К 7-му дню после использования ЭМСК постепенно их влияние исчезает, и активность воспалительного процесса в поврежденных тканях и присутствие там детрита возрастает. Однако, к этому моменту края кожного разреза уже консолидировались, и элиминация детрита с раневым отделяемым наружу становится невозможной, детрит лизируется на месте, а продукты его деградации поступают в лимфатическую систему, эмболизируют лимфатические сосуды и узлы, усиливая отек тканей. В тканях присутствует еще много нелизированного детрита, в том числе происходящего из нежизнеспособных мышц, а также большое количество костных частиц, и этот детрит рассасывается макрофагами через их слияние с образованием многоядерных форм — инициацию гранулематозного воспалительного процесса.

Наиболее вероятно, что именно из-за такой задержки лизиса и элиминации детрита, в тканях даже на 10-е сутки на фоне использования ЭМСК найден бесструктурный детрит с небольшим числом клеточных элементов, а также большее число многоядерных макрофагов со

слившейся цитоплазмой и нежизнеспособных костных фрагментов с меньшей степенью их деградации.

Необходимо обратить внимание еще на один результат гистологического изучения тканей после влияния ЭМСК. Значительное количество гигантских клеток инородных тел рядом с некротизированными мышечными симпластами и костными фрагментами и в формирующейся соединительной ткани может свидетельствовать, что в условиях супрессии ЭМСК лимфоцитов [9, 12] и нейтрофилов [12, 13, 14] их функции компенсируются макрофагами, которые, наоборот, активируются ЭМСК [13]. Это несколько замедляет воспалительный процесс и может придать ему характер гранулематозного.

Заключение

Таким образом, в результате влияния ЭМСК в мягких тканях рядом с участком повреждения проксимального мышечка большеберцовой кости в процессе внедрения металлического винтового имплантата уменьшается активность послеоперационной воспалительной реакции, что приводит к замедлению рассасывания геморрагий, элиминации фибриновых сгустков, детрита и мелких костных фрагментов. Супрессия воспаления задерживает очищение послеоперационной раны, способствует пролонгации репаративного процесса и присоединению к воспалению гранулематозного компонента. Применение ЭМСК в процессе интраоссальной имплантации может быть показано только для контроля активности воспалительного процесса и при условии максимального предварительного очищения послеоперационной раны от детрита, в том числе нежизнеспособной мышечной ткани и костных фрагментов.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке ПФНИ ГАН на 2017–2020 гг. (VI.62.2.1, 0309-2016-0006) «Разработка технологий получения материалов для регенеративной медицины и развитие методов восстановления репродуктивного здоровья». Финансовой поддержки со стороны компаний-производителей лекарственных препаратов и изделий медицинского назначения авторы не получали.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этические аспекты.

Одобрение комитета по этике

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zigdon-Giladi H, Bick T, Lewinson D, Machtei EE. Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells stimulate bone regeneration and mineral density. *J Periodontol.* 2014 Jul;85(7):984-90. doi: 10.1902/jop.2013.130475
2. Conklin LS, Hanley PJ, Galipeau J, Barrett J, Boland CM. Intravenous mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel disease: Lessons from the acute graft versus host disease experience. *Cytotherapy.* 2017 Jun;19(6):655-667. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.03.006
3. Bahrami B, Hosseini A, Talei AR, Ghaderi A, Razmkhah M. Adipose derived stem cells exert immunomodulatory effects on natural killer cells in breast cancer. *Cell J.* 2017 Apr-Jun;19(1):137-45. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5241510>
4. Abdelhamid L, Hussein H, Ghanem M, Eissa N. Retinoic acid-mediated anti-inflammatory responses in equine immune cells stimulated by LPS and allogeneic mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci.* 2017 Oct;114:225-32. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.05.006
5. Qu M, Yuan X, Liu D, Ma Y, Zhu J, Cui J, Yu M, Li C, Guo D. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Immune-Mediated Liver Injury and Compromise Virus Control During Acute Hepatitis B Virus Infection in Mice. *Stem Cells Dev.* 2017 Jun 1;26(11):818-27. doi: 10.1089/scd.2016.0348
6. Grange C, Tapparo M, Bruno S, Chatterjee D, Quesenberry PJ, Tetta C, Camussi G. Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int J Mol Med.* 2014 May;33(5):1055-63. doi: 10.3892/ijmm.2014.1663
7. Doeppner TR, Herz J, Görgens A, Schlechter J, Ludwig AK, Radtke S, de Miroshedji K, Horn PA, Giebel B, Hermann DM. Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent post-ischemic immunosuppression. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Oct;4(10):1131-43. doi: 10.5966/sctm.2015-0078
8. Майбородин ИВ, Шевела АА, Марчуков СВ, Морозов ВВ, Матвеева ВА, Майбородина ВИ, Новиков АМ, Шевела АИ. Регенерация костного дефекта в условиях экспериментального применения экстрацеллюлярных микровезикул мультипотентных стромальных клеток. *Новости Хирургии.* 2020;28(4):366-69. doi: 10.18484/2305-0047.2020.4.359
9. Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, Alvarez V, Tarazona R, Casado JG. Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells. *Front Immunol.* 2014 Nov 4;5:556. doi: 10.3389/fimmu.2014.00556. eCollection 2014.
10. Zhang S, Chu WC, Lai RC, Lim SK, Hui JH, Toh WS. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016 Dec;24(12):2135-40. doi: 10.1016/j.joca.2016.06.022
11. Sun X, Xu M, Cao Q, Huang P, Zhu X, Dong

X. A lysosomalK(+) channel regulates large particle phagocytosis by facilitating lysosome Ca(2+) release. *Sci Rep.* 2020;10(1):1038. doi: 10.1038/s41598-020-57874-2

12. Simonson OE, Mougiakakos D, Heldring N, Bassi G, Johansson HJ, Dalén M, Jitschin R, Rodin S, Corbascio M, El Andaloussi S, Wiklander OP, Nordin JZ, Skog J, Romain C, Koestler T, Hellgren-Johansson L, Schiller P, Joachimsson PO, Hägglund H, Mattsson M, Lehtiö J, Faridani OR, Sandberg R, Korsgren O, Krampera M, Weiss DJ, Grinnemo KH, Le Blanc K. In vivo effects of mesenchymal stromal cells in two patients with severe acute respiratory distress syndrome. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Oct;4(10):1199-213. doi: 10.5966/sctm.2015-0021

13. Tan JL, Lau SN, Leaw B, Nguyen HPT, Salomonson LA, Saad MI, Chan ST, Zhu D, Krause M, Kim C, Sievert W, Wallace EM, Lim R. Amnion epithelial cell-derived exosomes restrict lung injury and enhance endogenous lung repair. *Stem Cells Transl Med.* 2018 Feb;7(2):180-96. doi: 10.1002/sctm.17-0185

14. Harrell CR, Miloradovic D, Sadikot R, Fellabaum C, Markovic BS, Miloradovic D, Acovic A, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular and cellular mechanisms responsible for beneficial effects of mesenchymal stem cell-derived product "Exo-d-MAPPS" in attenuation of chronic airway inflammation. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2020 Mar 20;2020:3153891. doi: 10.1155/2020/3153891. eCollection 2020.

REFERENCES

1. Zigdon-Giladi H, Bick T, Lewinson D, Machtei EE. Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells stimulate bone regeneration and mineral density. *J Periodontol.* 2014 Jul;85(7):984-90. doi: 10.1902/jop.2013.130475

2. Conklin LS, Hanley PJ, Galipeau J, Barrett J, Boland CM. Intravenous mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel disease: Lessons from the acute graft versus host disease experience. *Cytotherapy.* 2017 Jun;19(6):655-667. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.03.006

3. Bahrami B, Hosseini A, Talei AR, Ghaderi A, Razmkhah M. Adipose derived stem cells exert immunomodulatory effects on natural killer cells in breast cancer. *Cell J.* 2017 Apr-Jun;19(1):137-45. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5241510>

4. Abdelhamid L, Hussein H, Ghanem M, Eissa N. Retinoic acid-mediated anti-inflammatory responses in equine immune cells stimulated by LPS and allogeneic mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci.* 2017 Oct;114:225-32. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.05.006

5. Qu M, Yuan X, Liu D, Ma Y, Zhu J, Cui J, Yu M, Li C, Guo D. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Immune-Mediated Liver Injury and Compromise Virus Control During Acute Hepatitis B Virus Infection in Mice. *Stem Cells Dev.* 2017 Jun 1;26(11):818-27. doi: 10.1089/scd.2016.0348

6. Grange C, Tapparo M, Bruno S, Chatterjee D,

Quesenberry PJ, Tetta C, Camussi G. Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int J Mol Med.* 2014 May;33(5):1055-63. doi: 10.3892/ijmm.2014.1663

7. Doeppner TR, Herz J, Görgens A, Schlechter J, Ludwig AK, Radtke S, de Miroshedji K, Horn PA, Giebel B, Hermann DM. Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent post-ischemic immunosuppression. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Oct;4(10):1131-43. doi: 10.5966/sctm.2015-0078

8. Maiborodin IV, Shevela AA, Marchukov SV, Morozov VV, Matveeva VA, Maiborodina VI, Novikov AM, Shevela AI. Regeneration of the bone defect at experimental application of extracellular microvesicles from multipotent stromal cells. *Novosti Khirurgii.* 2020;28(4):366-69. doi: 10.18484/2305-0047.2020.4.359 (In Russ.)

9. Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, Alvarez V, Tarazona R, Casado JG. Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells. *Front Immunol.* 2014 Nov 4;5:556. doi: 10.3389/fimmu.2014.00556. eCollection 2014.

10. Zhang S, Chu WC, Lai RC, Lim SK, Hui JH, Toh WS. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016 Dec;24(12):2135-40. doi: 10.1016/j.joca.2016.06.022

11. Sun X, Xu M, Cao Q, Huang P, Zhu X, Dong X. A lysosomalK(+) channel regulates large particle phagocytosis by facilitating lysosome Ca(2+) release. *Sci Rep.* 2020;10(1):1038. doi: 10.1038/s41598-020-57874-2

12. Simonson OE, Mougiakakos D, Heldring N, Bassi G, Johansson HJ, Dalén M, Jitschin R, Rodin S, Corbascio M, El Andaloussi S, Wiklander OP, Nordin JZ, Skog J, Romain C, Koestler T, Hellgren-Johansson L, Schiller P, Joachimsson PO, Hägglund H, Mattsson M, Lehtiö J, Faridani OR, Sandberg R, Korsgren O, Krampera M, Weiss DJ, Grinnemo KH, Le Blanc K. In vivo effects of mesenchymal stromal cells in two patients with severe acute respiratory distress syndrome. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Oct;4(10):1199-213. doi: 10.5966/sctm.2015-0021

13. Tan JL, Lau SN, Leaw B, Nguyen HPT, Salomonson LA, Saad MI, Chan ST, Zhu D, Krause M, Kim C, Sievert W, Wallace EM, Lim R. Amnion epithelial cell-derived exosomes restrict lung injury and enhance endogenous lung repair. *Stem Cells Transl Med.* 2018 Feb;7(2):180-96. doi: 10.1002/sctm.17-0185

14. Harrell CR, Miloradovic D, Sadikot R, Fellabaum C, Markovic BS, Miloradovic D, Acovic A, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular and cellular mechanisms responsible for beneficial effects of mesenchymal stem cell-derived product "Exo-d-MAPPS" in attenuation of chronic airway inflammation. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2020 Mar 20;2020:3153891. doi: 10.1155/2020/3153891. eCollection 2020.

Адрес для корреспонденции

630090, Российская Федерация,
г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, д. 8,
Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН,
Центр новых медицинских технологий,
тел.: +7-913-753-0767,

Address for correspondence

630090, Russian Federation,
Novosibirsk, Ak. Lavrentyev Avenue, 8,
Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine, Russian Academy of Sciences,
Siberian Branch Center of New Medical Technologies
tel.: +7-913-753-0767

e-mail: imai@mail.ru

Майбородин Игорь Валентинович

Сведения об авторах

Майбородин Игорь Валентинович, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитологии и клеточной биологии Института молекулярной патологии и патоморфологии, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, главный научный сотрудник лаборатории технологий управления здоровьем, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0002-8182-5084>

Шевела Александр Андреевич, к.м.н., докторант лаборатории технологий управления здоровьем, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<http://orcid.org/0000-0001-9235-9384>

Марчуков Сергей Вадимович, к.м.н., докторант лаборатории технологий управления здоровьем, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0002-7381-5820>

Морозов Виталий Валерьевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией технологий управления здоровьем, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0002-9810-5593>

Матвеева Вера Александровна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории технологий управления здоровьем, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<https://orcid.org/0000-0002-8706-4853>

Майбородина Виталина Игоревна, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории ультраструктурных основ патологии Института молекулярной патологии и патоморфологии, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<http://orcid.org/0000-0002-5169-6373>

Новиков Алексей Михайлович, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск, Российская Федерация.

<http://orcid.org/0000-0003-1371-7492>

Торнуев Юрий Васильевич, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории общей патологии и патоморфологии Института молекулярной патологии и патоморфологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации,

e-mail: imai@mail.ru

Maiborodin Igor V.

Information about the authors

Maiborodin Igor V., MD, Professor, Chief Researcher of the Laboratory of Cell Biology and Cytology, Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Chief Researcher of the Laboratory of Health Management Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-8182-5084>

Shevela Aleksandr A., Ph.D, Doctoral Student, the Laboratory of Health Management Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0001-9235-9384>

Marchukov Sergey V., Ph.D, Doctoral Student, the Laboratory of Health Management Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-7381-5820>

Morozov Vitaly V., MD, Professor, Head of the Laboratory of Health Management Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-9810-5593>

Matveeva Vera A., PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Health Management Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-8706-4853>

Maiborodina Vitalina I., MD, Leading Researcher, the Laboratory of Ultrastructural Basis of Pathology, Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0002-5169-6373>

Novikov Alexey M., Junior Researcher, the Laboratory of Cell Technology, Institute of Clinical and Experimental Lymphology, the Branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», The Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0003-1371-7492>

Tornuev Yury V., MD (Biol), Professor, Chief Researcher, the Laboratory of General Pathology and Pathomorphology, Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine» of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0001-8629-8909>

Churin Boris V., MD, Professor, Chief Researcher, the Laboratory of Cell Biology and Cytology, Institute of

г. Новосибирск, Российская Федерация.

<http://orcid.org/0000-0001-8629-8909>

Чурин Борис Васильевич, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории цитологии и клеточной биологии Института молекулярной патологии и патоморфологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<http://orcid.org/0000-0001-9742-6152>

Шевела Андрей Иванович, д.м.н., профессор, заведующий отделом «Центр новых медицинских технологий», Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.

<http://orcid.org/0000-0002-3164-9377>

Информация о статье

Поступила 30 октября 2020 г.

Принята в печать 7 июня 2021 г.

Доступна на сайте 1 сентября 2021 г.

Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine» of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0001-9742-6152>

Shevela Andrey I., MD, Professor, Head of Department “Center of New Medical Technologies”, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, The Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0002-3164-9377>

Article history

Arrived: 30 October 2020

Accepted for publication: 7 June 2021

Available online: 1 September 2021